UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

Renata Marschner

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ADJUVANTE DA MELITINA À TEMOZOLOMIDA EM CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA U138

Porto Alegre
2025

Renata Marschner

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ADJUVANTE DA MELITINA À TEMOZOLOMIDA EM CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA U138

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Bioquímica.

Orientador(a): Prof. Dr. Fabrício Figueiró

Porto Alegre

2025

Agradecimentos

Em primeiro lugar, dedico minha sincera gratidão à minha família, pilar de sustentação em toda a minha trajetória, especialmente durante os estudos. Aos meus avós, Sadi e Hilda, e à minha mãe, Rose, por me ensinarem o valor e o prazer do aprendizado e por criarem as condições necessárias para que este sonho se realizasse. Aos meus padrinhos Renan e Neia, que me deram a força inicial assim que cheguei a Porto Alegre, me ajudando sempre que precisei e me acolhendo na sua casa no início desta jornada. Obrigada por tudo que me proporcionaram e por todo o apoio durante a caminhada.

Ao meu orientador, Fabrício, pela confiança que depositou em mim e por ter aceitado o desafio de trabalhar com uma molécula nova que carreguei comigo desde o início. Sou imensamente grata por tudo que aprendi no Laboratório 22 e por todas as oportunidades oferecidas.

Aos meus colegas de laboratório, por tornarem os momentos mais difíceis da rotina científica mais leves. Em especial, ao meu grupo de apoio, os "Biomolers", Augusto e Arieli, que me acolheram no início da pós-graduação, mostrando-me o caminho e estando sempre presentes, mesmo à distância, para rir, chorar ou revisar um protocolo de PCR. Sua amizade se tornou parte essencial da minha vida, tanto que são os padrinhos da minha filha. Levarei essa amizade para sempre.

Aos demais que contribuíram para esta pesquisa, ainda durante a graduação, e me deram força para chegar até aqui. Um agradecimento especial ao Dr. Daniel Graichen e à Dra. Nilce Coelho Peixoto. Sou grata por todo o conhecimento e base que me proporcionaram; sem vocês, esta continuidade não seria possível.

Aos funcionários da bioquímica, sempre solícitos. Em especial, ao Marcelo, que gentilmente abria a porta nas noites e madrugadas de trabalho, e à Ana, por todo auxílio e disponibilidade.

Ao meu marido, Kelvin, que conheci no meio dessa jornada e que a abraçou comigo. Foi minha carona e companhia nas noites longas de experimentos. Obrigada por toda a compreensão, amor, carinho, força e a paciência em emprestar seus ouvidos para incontáveis relatos sobre meus achados e experimentos frustrados.

À minha filha, Theodora, que finalizou este mestrado comigo, foi uma parceirinha muito tranquila até aqui. Agora, aguardamos ansiosamente a sua chegada, a qualquer momento!

Por fim, um afetuoso agradecimento à minha companheira de quatro patas, Nina Maria, que me acompanhou fielmente durante toda a escrita desta dissertação, aliviando a tensão da jornada com sua presença constante e inconfundível fofura.

Agradeço também à CAPES pela bolsa de mestrado concedida, e às demais agências financiadoras que ofereceram os recursos essenciais para a realização desta dissertação.

Sumário

Resumo 6

Abstract 7

Lista de Abreviaturas 8

1. INTRODUÇÃO 10

1.1 Glioblastoma 10

1.2 Microambiente tumoral 12

1.3 Tratamentos convencionais 14

1.4 Tratamentos alternativos: melitina 16

2. OBJETIVOS 18

2.1 Objetivo geral 18

2.2 Objetivos específicos 18

3. ARTIGO CIENTÍFICO 19

4. DISCUSSÃO 41

5. CONCLUSÃO 48

REFERÊNCIAS 49

Resumo

O glioblastoma (GBM) é o tipo mais comum e agressivo de tumor cerebral do sistema nervoso central. O tratamento padrão consiste em quimioterapia com temozolomida (TMZ), cirurgia e radioterapia e permanece inalterado desde seu estabelecimento, em 2009. No entanto, o prognóstico para pacientes adultos com GBM submetidos aos tratamentos convencionais disponíveis atualmente permanece entre 12 e 15 meses de sobrevida. Estudos recentes observaram que pelo menos 50% dos pacientes tratados com TMZ não respondem à quimioterapia e que a maioria apresenta recidiva. Entre os fatores que contribuem para a resistência à quimioterapia está a elevada expressão da enzima O6-metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT) nos pacientes. Com base nesses dados, iniciamos alguns testes com melitina (MLT), um peptídeo derivado do veneno da abelha *Apis ssp.*, que, em estudos recentes, demonstrou propriedades antineoplásicas. A TMZ induziu a diminuição da viabilidade celular da linhagem U138 apenas nas concentrações mais altas (400 e 500 μM), matando em torno de 50% das células numa concentração de 500 μM. Entretanto, os grupos tratados com o cotratamento de TMZ (500 μM) e MLT (6 μg/mL) atingiram, em média, 70% de mortalidade. De acordo com a literatura, a TMZ induz a parada do ciclo celular na fase G2/M. No presente estudo *in vitro,* com a linhagem celular U138MG, a TMZ, na presença de MLT, aumentou ainda mais o número de células nessa fase, levando à apoptose por meio do aumento da expressão de caspase-3. Além disso, o tratamento concomitante reduziu a expressão de MGMT, mas não alterou a expressão de CD39, Tim-3 e PD-L1, marcadores importantes de resistência tumoral, em comparação ao grupo TMZ. Com estudos adicionais, a MLT poderá se tornar uma terapia adjuvante para GBM, potencialmente ressensibilizando as células tumorais à quimioterapia padrão, melhorando a resposta do paciente e, consequentemente, suas chances de sobrevivência.

Palavras-chave: Apis. Glioma. Quimioterapia. Ressensibilização. Terapia alternativa.

Abstract

Glioblastoma (GBM) is the most common and aggressive type of brain tumor in the central nervous system. Standard treatment consists of chemotherapy with temozolomide (TMZ), surgery, and radiotherapy, and has remained unchanged since its establishment in 2009. However, the prognosis for adult GBM patients undergoing currently available conventional treatments remains between 12 and 15 months of survival. Recent studies have observed that at least 50% of patients treated with TMZ do not respond to chemotherapy and that most of them relapse. Among the factors contributing to chemotherapy resistance is the high expression of the enzyme O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) in patients. Based on these data, we initiated some tests with melittin (MLT), a peptide derived from the venom of the *Apis ssp.* bees, which, in recent studies, has demonstrated antineoplastic properties. TMZ reduced cell viability in the U138 cell line only at the highest concentrations (400 and 500 μM), killing approximately 50% of cells at 500 μM. However, the groups treated with co-treatment of TMZ (500 μM) and MLT (6 μg/mL) had an average mortality rate of 70%. According to the literature, TMZ induces cell cycle arrest in the G2/M phase. In the present *in vitro* study using the U138MG cell line, TMZ, in the presence of MLT, further increased the number of cells in this phase, leading to apoptosis via increased caspase-3 expression. Furthermore, concomitant treatment reduced MGMT expression but did not alter the expression of CD39, Tim-3, and PD-L1, important markers of tumor resistance, compared to the TMZ group. With further studies, MLT could become an adjuvant therapy for GBM, potentially resensitizing tumor cells to standard chemotherapy, improving patient response and, consequently, survival outcomes.

Keywords
Alternative therapy. Apis. Chemotherapy. Glioma. Resensitization.

Lista de Abreviaturas

2-NBDG 2-desoxi-2- [(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-il) amino] -D-glicose) (do inglês, *2-Deoxy-2-[(7-nitro-2, 3-benzoxadiazol-4-yl)amino]-D-glucose*)

AIC 5-amino-imidazol-4-carboxamida

CAFs Fibroblastos associados ao tumor (do inglês, *Cancer-associated fibroblasts*)

CTLA-4 Proteína 4 Associada a Linfócitos T Citotóxicos (do inglês, *Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*)

DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO Dimetilsulfóxido

FDA Administração de Alimentos e Medicamentos dos EUA (do inglês, *Food and Drug Administration*)

GBM Glioblastoma Multiforme

IDH Isocitrato desidrogenase

MGMT O6-metilguanina-DNA metiltransferase

MHC Complexo Principal de Histocompatibilidade (do inglês, *Major Histocompatibility Complex*)

MLT Melitina

MMPs metaloproteínas de matriz (do inglês, *Matrix metalloproteinases*)

MTIC (5-(3-metiltriazen-1-il)imidazol-4-carboxamida)

MTT 3-[4,5- dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide

OMS Organização Mundial da Saúde

PD-1 Receptor de Morte Celular Programada 1 (do inglês, *Programmed cell death protein 1*)

PD-L1 Ligante de Morte Celular Programada-1 (do inglês, *Programmed death-ligand 1*)

SNC Sistema Nervoso Central

TAMs Macrófagos Associados ao Tumor (do inglês, *Tumor-associated macrophages*)

TCR Receptor de Célula T (do inglês, *T-cell receptor*)

Tim-3 Imunoglobulina de Células T e Domínio 3 da Mucina (do inglês *T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3*)

TME Microambiente tumoral (do inglês, *Tumor microenvironment*)

TMRE Éster Etílico de Tetrametilrodamina (do inglês, *Tetramethylrhodamine ethyl ester*)

TMZ Temozolomida

1. INTRODUÇÃO

1.1 Glioblastoma

Gliomas são tumores cerebrais que se desenvolvem a partir de células-tronco ou progenitoras neurais que apresentam alterações genéticas iniciais associadas à tumorigênese (Weller et al., 2024). Eles são classificados em quatro graus pela Organização Mundial da Saúde (OMS), sendo que o glioblastoma multiforme (GBM) é classificado como grau IV (Louis et al., 2016). O GBM é o tipo mais comum e agressivo de tumor cerebral do sistema nervoso central (Lacroix et al., 2001). A idade média dos pacientes diagnosticados é de 65 anos (Ostrom et al., 2019) e a incidência global é de 3 por 100.000 por ano, aumentando de acordo com a idade do paciente, também demonstrando maior incidência em pacientes do sexo masculino (Leece et al., 2017; Ostrom et al., 2019).

GBMs são originados a partir de células da glia ou células precursoras, possuem rápida proliferação, infiltração difusa no tecido cerebral, além de uma alta taxa de angiogênese, estando entre os tumores humanos mais vascularizados e de alta instabilidade genômica (Furnari et al., 2007; Wen & Kesari, 2008). O seu perfil molecular complexo afeta diretamente a patogênese da doença, o que impulsiona seu perfil agressivo (Tang et al., 2025). Assim, a partir da quinta edição da Classificação de Tumores do Sistema Nervoso Central (SNC) da OMS, publicada em 2021, a mais atual até o momento, o GBM passa a ser diagnosticado molecularmente, separando os glioblastomas com a enzima isocitrato desidrogenase (IDH) selvagem (glioblastoma, IDH-selvagem, Grau IV), que possui taxas de sobrevivência muito baixas (33% de sobrevida em um ano), daqueles com IDH mutada (astrocitoma, IDH-mutante, Grau IV), que possuem melhor prognóstico (Encarnación et al., 2025; Louis et al., 2021).

Anteriormente, o prognóstico de pacientes adultos com GBM submetidos à quimioterapia, cirurgia e radioterapia padrão era de 12 a 15 meses de sobrevida (Olar & Aldape, 2014). Isso ocorre devido à alta taxa de proliferação, à heterogeneidade celular no microambiente tumoral e à elevada taxa de recorrência apesar do tratamento (Bernardi et al., 2012). Com a atualização do diagnóstico da doença, o prognóstico dos pacientes também muda. Adultos diagnosticados com glioblastoma, IDH-selvagem, submetidos ao tratamento padrão, possuem sobrevida de cerca de 12,3 meses, já pacientes diagnosticados com astrocitoma grau IV, IDH-mutante, possuem sobrevida de 38,4 meses (Olar & Aldape, 2014).

Como já citado anteriormente, o GBM possui alta instabilidade genômica e um complexo perfil molecular, sendo estas características fatores que influenciam a sua alta mortalidade e resistência (Furnari et al., 2007). Dentre as mutações mais frequentes, estão as altas taxas de mutações espontâneas em gliomas difusos no gene que codifica a isocitrato desidrogenase 1 (IDH1), incluindo linhagens astrogliais e oligodendrogliais de graus II e III da OMS (Balss et al., 2008; Watanabe et al., 2009). Porém, a partir da nova nomenclatura desenvolvida pela OMS, esta mutação está presente apenas em astrocitoma e oligodendroglioma, que se diferenciam do astrocitoma pela combinação da mutação em IDH1 com a ausência de 2 braços cromossômicos (1p e 19q) (Louis et al., 2021). Também ocorrem alterações nas taxas de expressão de muitas proteínas importantes que controlam processos de crescimento, comunicação, invasão e interação com o sistema imunológico. Em particular, a enzima O6-metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT), responsável pelo reparo do DNA danificado por agentes alquilantes (Hansen et al., 2007), alguns checkpoints imunes, como PD-1, CTLA-4 e Tim-3, envolvidos na evasão imune, e

marcadores de membrana, como o CD133, que também está envolvido em radio- e quimioresistência (Cho et al., 2011).

O câncer encontra maneiras de sequestrar e modular mecanismos biológicos normais em seu benefício, criando, assim, o microambiente tumoral perfeito para seu desenvolvimento . Durante muito tempo se acreditava que os tumores eram apenas um conjunto de células proliferativas em estado caótico e sem organização, porém agora já sabemos que essas células formam um complexo aglomerado, bem-organizado, juntamente a outros componentes capazes de favorecer as células tumorais, sendo este conjunto é conhecido como microambiente tumoral (TME) (Hanahan & Coussens, 2012; Quail & Joyce, 2013).

1.2 Microambiente tumoral

Dentre os componentes do TME, destacam-se os fibroblastos e macrófagos associados ao tumor (CAFs e TAMs, respectivamente), bem como os linfócitos infiltrantes do tumor (TILs). As CAFs podem liberar fatores de crescimento, promovendo a proliferação tumoral e contribuindo para a formação de metástases (Allen & Louise Jones, 2011). Já as TAMs são responsáveis por secretar moléculas imunossupressoras, como a IL-10 e o TGF-β, o que permite que o tumor se desenvolva sem ser detectado pelo organismo; um dos principais receptores expressos nas TAMs é o PD-1 (Najafi et al., 2019). Os TILs são os principais responsáveis pelo reconhecimento e destruição das células nocivas ao organismo (Chiou et al., 2005), e sua presença geralmente está associada a um melhor prognóstico (Gomes et al., 2023). Porém, com o aumento da expressão de moléculas imunossupressoras, como o TGF-β e a adenosina, a vigilância imunológica dos TILs é comprometida (L. Wang et al., 2024).

Os checkpoints imunes são responsáveis por regular e modular a resposta imune. O reconhecimento de antígenos pelos linfócitos T é realizado principalmente através da interação do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), que está presente nas células apresentadoras de antígeno (APCs), e do Receptor de Célula T (TCR), encontrado na superfície dos linfócitos T (Giannopoulos, 2019). Porém, a ativação descontrolada de linfócitos T poderia levar a doenças autoimunes, assim, checkpoints como CTLA-4 e PD-1 se tornam essenciais, por serem reguladores negativos, prevenindo a autoimunidade (Seidel et al., 2018).

Como foi citado anteriormente, existem também ligantes que inibem a resposta imune das células T, um dos mais conhecidos é a PD-1, muito presente em TAMs, que é uma proteína de superfície celular que limita a autoimunidade e a atividade de células T em uma resposta inflamatória à infecção (Freeman et al., 2000). Essa proteína contém dois ligantes, nos quais destaca-se o ligante de morte programada-1 (PD-L1) (Pardoll, 2012). A PD-L1 é uma proteína de superfície celular expressa em células neoplásicas, que, ao interagir com a PD-1 presente em células imunes, inibe o sinal (Pianko et al., 2017). A expressão desregulada desses checkpoints imunes pode contribuir para um microambiente tumoral de supressão do sistema imune, inibindo a ação citotóxica dos linfócitos T sobre as células do câncer (Yang et al., 2014).

Outra proteína que também se mostra impactada em pacientes com tumores malignos é a CD133, uma proteína de membrana com características de célula progenitora e fenótipo de célula-tronco tumoral. A expressão de CD133+ poderia ser um indicador molecular de disseminação de glioblastoma, além de estar associada à radio- e quimiorresistência em gliomas, demonstrando maior capacidade de reparo do DNA em células CD133+ (Cho et al., 2011). Outros marcadores de membrana

envolvidos na resistência tumoral são as enzimas CD39 e CD73 do sistema purinérgico. Estas ectonucleotidases são conhecidas pelo seu papel na produção de adenosina, a CD39 catalisa a hidrólise de ATP em ADP e então AMP, enquanto a CD73 é responsável pela hidrólise de AMP em adenosina (Shen et al., 2025). A adenosina reduz a expressão do MHC, e inibe a ligação do TCR ao seu ligante, afetando negativamente a apresentação de antígenos às células T e também é responsável por suprimir a secreção de citocinas antitumorais (L. Wang et al., 2024), promovendo um ambiente imunossuprimido que propicia o crescimento e evasão tumoral. Já o Tim-3 é um checkpoint imunológico regulador da resposta inflamatória e inibidor de processos autoimunes e de proliferação tumoral (Knutson & Disis, 2005).

1.3 Tratamentos convencionais

Os tratamentos atuais para glioblastoma e astrocitomas incluem cirurgia e uma combinação de radiação e o agente alquilante oral temozolomida (TMZ) (Lee, 2016; Stupp et al., 2017). A TMZ foi aprovada pela Food and Drug Administration (FDA) dos EUA em 2005 para o tratamento de pacientes adultos com GBM recém-diagnosticados (Lee, 2016). A FDA comprovou que o tratamento com temozolomida administrada concomitantemente com radioterapia cerebral e utilizada posteriormente como quimioterapia de manutenção se mostrou mais eficaz do que apenas a radioterapia isolada, aumentando a sobrevida dos pacientes de 12,1 para 14,6 meses de vida (Cohen et al., 2005).

Em estudos recentes, observou-se que pelo menos 50% dos pacientes tratados com TMZ não respondem à quimioterapia (Lee, 2016) e praticamente todos sofrem reincidência do tumor (Birzu et al., 2020). A alta taxa de pacientes que não respondem ao quimioterápico se dá em decorrência principalmente da alta expressão

de MGMT e CD133, que geralmente ocorre de maneira concomitante, ou seja, células de GBM CD133+ apresentam maior expressão de MGMT (Liu et al., 2006). A MGMT, como já mencionado, é responsável pelo reparo do DNA danificado por agentes alquilantes (Kaina et al., 2007). Em condições normais, ou seja, quando o organismo está em homeostase, a MGMT atua como protetora do genoma contra agentes mutagênicos do ambiente, como a fumaça do tabaco, alimentos ou produtos metabólicos endógenos (Hansen et al., 2007; Kaina et al., 2007), que podem gerar espécies reativas que alquilam o DNA (Kaina et al., 2007). Os agentes alquilantes são considerados de ação inespecífica e agem em células de rápida proliferação, como câncer, mas também como a medula óssea, e células do trato gastrointestinal (Blijham, 1993), podendo inclusive levar a cânceres secundários, anos após a quimioterapia (Ralhan & Kaur, 2007). A TMZ é um agente alquilante que age danificando o DNA, o que leva à morte programada da célula afetada (J. Zhang et al., 2012) e, assim como outros agentes alquilantes, possui ação não seletiva, causando efeitos adversos ao afetar outras células saudáveis de rápida replicação.

Em alguns casos, o benefício da utilização de agentes alquilantes supera seus malefícios, um destes casos é o próprio câncer, que utiliza alguns destes agentes devido às suas propriedades citotóxicas (Kaina et al., 2007). A TMZ é um agente alquilante que transfere grupos alquilantes às bases de guanina, causando danos ao DNA e, consequentemente, à morte celular (Olar & Aldape, 2014). Estudos mostraram que 50% dos pacientes recém-diagnosticados com glioblastoma apresentam o promotor de MGMT metilado (Hegi et al., 2005; Ohka et al., 2011; Olar & Aldape, 2014; Preusser et al., 2008). Quando o promotor de MGMT está metilado, o gene MGMT fica silenciado, o que melhora a taxa de sobrevida dos pacientes (Olson et al., 2011). Porém, estes dados também mostram que metade dos pacientes

diagnosticados com glioblastoma provavelmente se mostrarão resistentes à terapia, já que apresentam o promotor de MGMT desmetilado e, portanto, o gene ativo e a função de reparo do DNA da enzima MGMT funcional. Isso permite que a célula evada a morte programada, constituindo um mecanismo de resistência quimioterápica em pacientes (Stupp et al., 2017). No Brasil, não é uma prática comum a quantificação da MGMT, especialmente pelo SUS, o que cria mais barreiras no tratamento adequado dos pacientes.

1.4 Tratamentos alternativos: melitina

A MLT é um peptídeo simples, constituído por 26 aminoácidos, que constitui a maior parte do veneno de abelhas *Apis mellifera* por peso seco (Guha et al., 2021). Alguns estudos recentes apontam que este peptídeo induz a apoptose em alguns tipos de células cancerígenas, além de inibir o crescimento e a migração dessas células (Duffy et al., 2020). Estudos *in vitro* indicam que a apitoxina, veneno da abelha do gênero *Apis*, possui propriedades citotóxicas e inibitórias sobre a secreção de metaloproteínas 2 e 9 (MMPs) em linhagens selecionadas de glioma, sugerindo atividade anticancerígena (Małek et al., 2022). As MMPs são enzimas envolvidas na migração e na invasão do tecido cerebral circundante, aumentando a taxa de invasão em gliomas e influenciando negativamente o prognóstico do paciente (Aitchison et al., 2025).

A MLT tem potencial para induzir a morte celular. Quando introduzido no organismo, esse peptídeo se associa à membrana plasmática das células, formando um poro transmembrana que permite a entrada de moléculas citotóxicas, o que causa a ruptura da célula (Duffy et al., 2020). Assim como a TMZ, a MLT também possui ação inespecífica, podendo afetar células saudáveis (Rady et al., 2017). Porém, por

ser um peptídeo catiônico, apresenta maior atração por células com membranas mais negativas, e, enquanto as membranas de células saudáveis possuem uma carga mais neutra, as de células tumorais são notoriamente mais negativas (Chen et al., 2016; Rady et al., 2017).

Além disso, já há diversas pesquisas que mostram que a MLT está intimamente ligada à modulação da via PI3K/Akt/mTOR, regulando-a negativamente. De acordo com estes estudos, a MLT atua suprimindo o crescimento e a migração das células tumorais de melanoma e câncer de mama através, principalmente, da inibição da via de sinalização PI3K/Akt/mTOR e da ativação das caspases 3 e 9 (Jeong et al., 2014; Lim et al., 2019). Além disso, observou-se que a combinação da MLT com a TMZ aumenta a inibição do crescimento e da invasão em células de melanoma, em comparação com os tratamentos isolados (Lim et al., 2019). A MLT vem demonstrando efeitos terapêuticos em uma variedade de tumores (Li et al., 2022), podendo se tornar uma terapia inovadora adjunta às convencionais.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar se a melitina (MLT) pode atuar como adjuvante ao tratamento com temozolomida (TMZ), modulando a expressão de checkpoints imunes e marcadores associados à resistência da linhagem U138 de glioblastoma.

2.2 Objetivos específicos

- Definir as concentrações citotóxicas de TMZ e MLT, separadas e em cotratamento frente à linhagem U138;
- Analisar expressão de marcadores de membrana e proteínas envolvidas em quimiorresistência na linhagem U138 antes e depois da exposição aos compostos;
- Avaliar a progressão do ciclo celular e a morte celular na linhagem U138;
- Avaliar a funcionalidade mitocondrial e a captação de glicose e de ácidos graxos nas células U138.

4. DISCUSSÃO

Para avaliar o efeito da MLT, da TMZ e da sua combinação nas células U138MG, foi feita uma curva de concentração-efeito utilizando 5 concentrações diferentes de cada composto separadamente no tempo de 48h. Primeiramente, os compostos foram avaliados de maneira separada, MLT com concentrações de 1 a 50 µg/mL e TMZ nas concentrações de 50 a 500 µM e depois foram usadas as concentrações inibitórias (IC_{50} e IC_{25}) da MLT encontradas para analisar o cotratamento. Por ser uma molécula relativamente nova, os estudos ainda não utilizam seu peso molecular para cálculos de dosagem; assim, mantivemos o padrão e utilizamos uma unidade de medida diferente para cada composto. Além disso, estudos apontam que a MLT possui propriedade de autoassociação, dependendo do pH e salinidade do ambiente em que se encontra, a MLT transita entre a forma monômera e tetrâmera. Em ambientes com muito sal ou alto pH, a MLT tende a se agrupar, já em locais com baixo pH, a molécula é geralmente encontrada sozinha (Bello et al., 1982), o que afetaria sua massa molar, podendo comprometer o resultado da análise de concentração.

A confluência celular foi avaliada por meio de MTT. Não foi possível determinar as concentrações inibitórias da TMZ a partir das curvas de concentração por causa da resistência intrínseca das células (Gonzalez et al., 2025), ou seja, nenhuma concentração testada, considerando o limite de DMSO por poço, foi capaz de diminuir em 50% a viabilidade celular. Assim, definimos o IC_{50} (6.7 µg/mL) e IC_{25} (5.4 µg/mL) da melitina separadamente e a dose da TMZ foi definida a partir da sua interação com a MLT posteriormente. A confluência das células tratadas com MLT diminuiu de forma dose-dependente, atingindo níveis significativamente menores à medida que aumentava a concentração, chegando a quase zero na concentração mais alta.

A concentração da TMZ foi definida com base na literatura (Aleksandrov et al., 2025; Grogan et al., 2014; Ryu et al., 2012), na qual foi observado que células resistentes à TMZ, como U138MG, possuem uma concentração inibitória para a metade da população em torno de 500 μM e também na extrapolação da nossa curva de viabilidade. . A TMZ utilizada possuía um limite de solubilidade, não se solubilizando em concentrações acima de 10 mg/mL. Como o solvente utilizado é o DMSO, também observamos um limite de solubilidade no meio de cultura (DMSO<1%), assim, na prática, a TMZ não poderia ser diluída para uma concentração acima de 500 μM. A partir destas informações, testamos as concentrações de 400 e 500 μM, as doses mais altas possíveis, em conjunto com o IC_{50} e IC_{25} já definidos da MLT. Foi possível observar no gráfico que o cotratamento com de 6,7 μg/mL de MLT e 500 μM de TMZ obteve o maior efeito na redução da viabilidade de células U138, embora este efeito não possa ser considerado sinérgico.

A ação antiproliferativa da TMZ se deve à sua capacidade de metilar o DNA das células tumorais, isto gera danos que o sistema de reparo da célula não consegue corrigir, levando esta célula danificada à apoptose (J. Zhang et al., 2012). A lesão causada pela TMZ é uma metilação, um processo químico que ocorre em duas etapas principais: a ativação espontânea do pró-fármaco e a transferência do grupo metil para o DNA. A TMZ como pró-fármaco está em estado inativo e é espontaneamente ativada quando entra em ambiente com pH > 7, assim se tornando o intermediário MTIC. O MTIC é estável em pH alcalino, mas se fragmenta em um composto metilante em pH < 7, a molécula se divide em AIC e no cátion metildiazônio (CH3N2+), que então transfere seu grupo metil (CH3) para as bases nitrogenadas do DNA (Denny et al., 1994).

Já a MLT é conhecida por ter o potencial de induzir a morte celular. Quando introduzido no organismo, esse peptídeo se associa à superfície da membrana, que possui carga negativa, perturbando a integridade da bicamada fosfolipídica, formando poros transmembrana que permitem a entrada de moléculas citotóxicas na célula, causando sua ruptura (Duffy et al., 2020; Jamasbi et al., 2016). Como esperado, a MLT demonstrou ação citotóxica frente a linhagem U138, diminuiu a viabilidade celular em todas as concentrações testadas, matando quase 100% das células tratadas com as doses mais altas (25 e 50 µg/mL) e aumentou o efeito antiproliferativo da TMZ.

Por apresentar propriedade hemolítica, o que poderia se tornar uma grande limitação ao seu uso terapêutico, testamos o efeito da MLT com uma análise de hemólise utilizando sangue de pessoas saudáveis. O valor significativo de hemólise é um obstáculo para a utilização da MLT em tratamentos clínicos, especialmente com administração sistêmica. A morte de 18% das células sanguíneas vermelhas, observada no grupo tratado com MLT+TMZ, poderia causar problemas graves, como anemia aguda e dano renal (Hill & Hill, 2018; Rother et al., 2005). Felizmente, novos estudos (Duan et al., 2024; Rizkallah et al., 2025; A. Wang et al., 2022) já mostram maneiras de contornar este problema e entregar a droga de maneira segura, dentre os quais, especialmente, o encapsulamento da MLT a partir de nanocápsulas ou lipossomas.

A ação da TMZ baseia-se no dano que ela causa ao DNA, e já é amplamente descrito na literatura que este fármaco aumenta a parada do ciclo celular na fase G2/M (Tentori & Graziani, 2009; J. Zhang et al., 2012). Assim, decidimos analisar se a MLT poderia potencializar o efeito da TMZ. A parada no ciclo na fase G2/M consequentemente diminui o número de células em G1 e é um resultado bastante

observado em estudos de tratamentos para câncer em geral. Essa parada em G2/M sugere que há alguma interferência, como o dano no próprio DNA, nos processos necessários à mitose (Zhou & Elledge, 2000).

Apesar da parada em G2/M do grupo MLT e do grupo TMZ não mostrar diferença significativa entre si, a parada do ciclo no grupo tratado com MLT+TMZ em comparação ao grupo tratado apenas com TMZ foi significativa e indica que mais células sofreram danos em decorrência do cotratamento. O aumento da parada em G2/M indica que a MLT exerce um efeito aditivo sobre a ação citotóxica da TMZ. O mecanismo de ação primário da MLT é a destruição das membranas das células, mas este resultado demonstra que ela também está de alguma maneira interferindo nas vias que regulam o ciclo celular. A parada no ciclo celular, conjunta com aumento de caspase-3 ativa e anexina V, sugerem que as células estão sob estresse e que parte das células estão entrando em apotpose. Esses resultados são mais pronunciados quando as células são tratadas com MLT+TMZ.

A linhagem celular U138MG é conhecida por ser intrinsicamente resistente ao TMZ, apresentando baixa capacidade de sofrer apoptose após o tratamento. Mesmo com um aumento significativo em comparação aos grupos controle e veículo, os níveis de apoptose após o tratamento combinado ficaram próximos a 30%, enquanto a expressão de caspase-3 ativa foi de aproximadamente 20%. Isso pode ser explicado pelo aumento da expressão de Bcl-2 em gliomas e como esse aumento afeta a sobrevida do paciente ao bloquear as vias de apoptose. Em gliomas de alto grau, como o GBM, proteínas da família de genes Bcl-2 apresentam alta expressão (McDonald et al., 2002; Rieger et al., 1998; X.-F. Wang et al., 2012). Essas proteínas são antiapoptóticas e afetam diretamente a ativação da caspase-3, inibindo a permeabilização da membrana mitocondrial e bloqueando a cascata de caspases

(Cory & Adams, 2002). Se o tratamento estiver afetando a expressão dessas proteínas, isso poderia explicar os níveis mais elevados de caspase-3 ativa e a entrada das células nas vias de apoptose. Um ponto a ser considerado é que, embora os níveis de apoptose com o cotratamento não refletem a diminuição da viabilidade apresentada no MTT, muitas células podem não estar sendo captadas nos ensaios de “ponto final” da anexina/caspase-3 pois podem virar *debris* celulares durante as 48h de tratamento.

Embora a MLT seja uma molécula relativamente nova na pesquisa do câncer, diversos artigos já comprovaram que sua ação antitumoral deriva, em grande parte, da inibição da via PI3K/Akt/mTOR. De acordo com esses estudos, a MLT atua suprimindo o crescimento e a migração de células tumorais de melanoma e câncer de mama, principalmente por meio da regulação negativa da via de sinalização PI3K/AKT/mTOR e da ativação das caspases-3 e -9 (Jeong et al., 2014; Lim et al., 2019), o que poderia ser outra forma de aumentar os níveis de caspase-3 ativa e apoptose. Além disso, observou-se que a combinação de MLT com TMZ aumenta a inibição do crescimento e da invasão em células de melanoma em comparação com os tratamentos isolados (Lim et al., 2019). Também foi relatado que a ativação da Akt está envolvida na inibição da parada do ciclo celular na fase G2/M (Hirose et al., 2003); portanto, sua supressão poderia justificar o aumento dessa parada. No entanto, foi possível observar um aumento significativo de p-Akt nos grupos tratados com MLT+TMZ e com TMZ isoladamente, em comparação com o grupo tratado apenas com MLT. Como mencionado anteriormente, a linhagem celular U138MG é resistente ao TMZ e esse aumento de p-Akt é relatado como uma reação comum em células de glioma após o tratamento com TMZ (Tomar et al., 2020), levando à quimiorresistência (L.-H. Zhang et al., 2015).

Apesar do aumento de p-Akt, as células tratadas ainda demonstram significativa parada do ciclo celular na fase G2/M e aumento na taxa de apoptose, então analisamos a expressão de TGF-β, que também está intimamente ligada à via de sobrevivência PI3K/Akt/mTOR e à regulação do ponto de checagem G2/M. Porém, este também se mostrou significativamente mais elevado nos grupos tratados com TMZ e MLT+TMZ em relação ao grupo tratado apenas com MLT. Apesar do TGF-β agir como supressor tumoral em estágios iniciais do tumor, quando o tumor se desenvolve, seu papel muda para um promotor (Drabsch & ten Dijke, 2012). No caso do GBM, classificado como grau IV, o TGF-β geralmente atua como promotor tumoral (Golán-Cancela & Caja, 2024).

A MGMT é uma enzima que está diretamente ligada à radio e quimiorresistência. Ela entra em ação após ocorrer a parada no ciclo celular na fase G2/M, reparando o DNA afetado pela TMZ (Hirose et al., 2003). O aumento da expressão de MGMT no grupo tratado com TMZ indica que a própria presença do fármaco está induzindo a expressão da enzima, o que poderia sugerir uma nova estratégia de resistência adquirida desenvolvida pelo tumor. Na presença de MLT, a expressão de MGMT é mais baixa, chegando a perder a significância no grupo que recebeu o cotratamento, o que sugere uma diminuição da ação reparadora da enzima.

Os tratamentos não alteraram a captação lipídica, representada pelos níveis similares do Bodipy entre os grupos, também não afetando significativamente a função mitocondrial. Porém, apesar de não haver aumento na taxa de expressão de GLUT-1, houve aumento de 2-NBDG, sugerindo uma aceleração na taxa de captação da glicose. A parada do ciclo em G2/M, aumento da expressão de caspase-3 ativa e aumento de 2-NBDG, demonstra o estresse celular causado pelo tratamento e tentativa das células de reparar o dano causado ao seu DNA, já que a célula está

ativamente tentando obter mais glicose para evitar sua morte, um mecanismo metabolicamente dispendioso.

Ao avaliar os checkpoints PD-L1 e Tim-3, observamos um aumento em suas expressões, o que também indica resistência. Geralmente, quando uma célula expressa Tim-3+, ela também expressa PD-L1+, e uma célula com o fenótipo Tim-3+PD-L1+ está associada à exaustão de TILs (Sakuishi et al., 2010). No entanto, CD73 e CD133 não apresentaram alterações em suas expressões, enquanto CD39 mostrou uma expressão mais elevada após o tratamento. Essa inalteração de CD133 mostra que as células-tronco tumorais não foram eliminadas com os tratamentos, indicando uma possível resistência à terapia. Porém, a modulação causada por MLT+TMZ em CD39 leva a um perfil mais próximo ao de astrócitos do que ao de células de GBM (Dias et al., 2021), o que pode sugerir um perfil mais diferenciado e suscetível. Assim, apesar de ainda haver indicadores de resistência tumoral, é notável que a MLT possui um efeito aditivo sobre a ação da TMZ, aumentando seu potencial antiproliferativo. Juntos, os resultados obtidos sugerem que a MLT poderia ser uma potencial candidata para ensaios *in vivo* em conjunto a TMZ, assim que resolvida uma forma segura para a entrega da molécula.

5. CONCLUSÃO

Em conclusão, a alta taxa de hemólise ainda é uma limitação para a utilização da MLT *in vivo*, assim, os próximos passos são a formulação de uma nanocápsula lipídica para a entrega segura da MLT e uma análise dos métodos de entrega sistêmico e intranasal para definir qual possui melhor eficiência. Além disso, também temos como objetivo uma análise mais aprofundada dos mecanismos que podem estar ligados à diminuição da expressão de MGMT nas células tratadas com MLT+TMZ, já que a principal diferença entre o tratamento de TMZ e MLT+TMZ foi a diminuição na expressão desta enzima. Esta redução na expressão de MGMT viabiliza que a parada do ciclo celular na fase G2/M realmente possa levar a célula de GBM à uma rota apoptótica sem interferência da enzima MGMT reparando o DNA afetado. Também serão analisados os marcadores que demonstraram aumento de expressão para investigar se isto é parte de um mecanismo de escape imune adaptativo.

REFERÊNCIAS

Aitchison, E. E., Dimesa, A. M., & Shoari, A. (2025). Matrix Metalloproteinases in Glioma: Drivers of Invasion and Therapeutic Targets. *Biotech (Basel (Switzerland))*, *14*(2), 28. https://doi.org/10.3390/biotech14020028

Allen, M., & Louise Jones, J. (2011). Jekyll and Hyde: The role of the microenvironment on the progression of cancer. *The Journal of Pathology*, *223*(2), 163–177. https://doi.org/10.1002/path.2803

Balss, J., Meyer, J., Mueller, W., Korshunov, A., Hartmann, C., & von Deimling, A. (2008). Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathologica*, *116*(6), 597–602. https://doi.org/10.1007/s00401-008-0455-2

Bello, J., Bello, H. R., & Granados, E. (1982). Conformation and aggregation of melittin: Dependence on pH and concentration. *Biochemistry*, *21*(3), 461–465. https://doi.org/10.1021/bi00532a007

Bernardi, A., Frozza, R. L., Meneghetti, A., Hoppe, J. B., Battastini, A. M. O., Pohlmann, A. R., Guterres, S. S., & Salbego, C. G. (2012). Indomethacin-loaded lipid-core nanocapsules reduce the damage triggered by Aβ1-42 in Alzheimer's disease models. *International Journal of Nanomedicine*, *7*, 4927–4942. https://doi.org/10.2147/IJN.S35333

Birzu, C., French, P., Caccese, M., Cerretti, G., Idbaih, A., Zagonel, V., & Lombardi, G. (2020). Recurrent Glioblastoma: From Molecular Landscape to New Treatment Perspectives. *Cancers*, *13*(1), 47. https://doi.org/10.3390/cancers13010047

Blijham, G. H. (1993). Prevention and treatment of organ toxicity during high-dose chemotherapy: An overview. *Anti-Cancer Drugs*, *4*(5), 527–533. https://doi.org/10.1097/00001813-199310000-00001

Chen, B., Le, W., Wang, Y., Li, Z., Wang, D., Ren, L., Lin, L., Cui, S., Hu, J. J., Hu, Y., Yang, P., Ewing, R. C., Shi, D., & Cui, Z. (2016). Targeting Negative Surface Charges of Cancer Cells by Multifunctional Nanoprobes. *Theranostics*, *6*(11), 1887–1898. https://doi.org/10.7150/thno.16358

Chiou, S.-H., Sheu, B.-C., Chang, W.-C., Huang, S.-C., & Hong-Nerng, H. (2005). Current concepts of tumor-infiltrating lymphocytes in human malignancies. *Journal of Reproductive Immunology*, *67*(1–2), 35–50. https://doi.org/10.1016/j.jri.2005.06.002

Cho, D.-Y., Lin, S.-Z., Yang, W.-K., Hsu, D.-M., Lin, H.-L., Lee, H.-C., Lee, W.-Y., & Chiu, S.-C. (2011). The Role of Cancer Stem Cells ($CD133^{+}$) in Malignant Gliomas. *Cell Transplantation*, *20*(1), 121–125. https://doi.org/10.3727/096368910X532774

Cohen, M. H., Johnson, J. R., & Pazdur, R. (2005). Food and Drug Administration Drug Approval Summary: Temozolomide Plus Radiation Therapy for the Treatment of Newly Diagnosed Glioblastoma Multiforme. *Clinical Cancer Research*, *11*(19), 6767–6771. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-0722

Cory, S., & Adams, J. M. (2002). The Bcl2 family: Regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer*, *2*(9), 647–656. https://doi.org/10.1038/nrc883

Denny, B. J., Wheelhouse, R. T., Stevens, M. F., Tsang, L. L., & Slack, J. A. (1994). NMR and molecular modeling investigation of the mechanism of activation of the antitumor drug temozolomide and its interaction with DNA. *Biochemistry*, *33*(31), 9045–9051. https://doi.org/10.1021/bi00197a003

Dias, A. D. F., Scholl, J. N., Moritz, C. E. J., Kagami, L. P., Das Neves, G. M., Eifler-Lima, V. L., Cruz-López, O., Conejo-García, A., Sévigny, J., Battastini, A. M. O., Campos, J. M., & Figueiró, F. (2021). New insights into cytotoxic mechanisms of bozepinib against glioblastoma. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *162*, 105823. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2021.105823

Drabsch, Y., & ten Dijke, P. (2012). TGF-β signalling and its role in cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Reviews*, *31*(3–4), 553–568. https://doi.org/10.1007/s10555-012-9375-7

Duan, X., Zou, H., Yang, J., Liu, S., Xu, T., & Ding, J. (2024). Melittin-incorporated nanomedicines for enhanced cancer immunotherapy. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, *375*, 285–299. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2024.08.047

Duffy, C., Sorolla, A., Wang, E., Golden, E., Woodward, E., Davern, K., Ho, D., Johnstone, E., Pfleger, K., Redfern, A., Iyer, K. S., Baer, B., & Blancafort, P. (2020). Honeybee venom and melittin suppress growth factor receptor activation in HER2-enriched and triple-negative breast cancer. *NPJ Precision Oncology*, *4*, 24. https://doi.org/10.1038/s41698-020-00129-0

Encarnación, J. A., Manso, C., Royo-Villanova, M., Ruiz, P., De la Fuente, M. I., Cárdenas, E., Ros, S., & Alonso-Romero, J. L. (2025). Incidence and Survival of IDH-Wildtype Glioblastoma and IDH-Mutant Astrocytoma by Treatment and Sex: A Regional Study in Spain (2011-2021). *Medical Sciences (Basel, Switzerland)*, *13*(4), 233. https://doi.org/10.3390/medsci13040233

Freeman, G. J., Long, A. J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L. J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M. C., Horton, H. F., Fouser, L., Carter, L., Ling, V., Bowman, M. R., Carreno, B. M., Collins, M., Wood, C. R., & Honjo, T. (2000). Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *The Journal of Experimental Medicine*, *192*(7), 1027–1034. https://doi.org/10.1084/jem.192.7.1027

Furnari, F. B., Fenton, T., Bachoo, R. M., Mukasa, A., Stommel, J. M., Stegh, A., Hahn, W. C., Ligon, K. L., Louis, D. N., Brennan, C., Chin, L., DePinho, R. A., & Cavenee, W. K. (2007). Malignant astrocytic glioma: Genetics, biology, and paths to treatment. *Genes & Development*, *21*(21), 2683–2710. https://doi.org/10.1101/gad.1596707

Giannopoulos, K. (2019). Targeting Immune Signaling Checkpoints in Acute Myeloid Leukemia. *Journal of Clinical Medicine*, *8*(2), 236. https://doi.org/10.3390/jcm8020236

Golán-Cancela, I., & Caja, L. (2024). The TGF-β Family in Glioblastoma. *International Journal of Molecular Sciences*, *25*(2), 1067. https://doi.org/10.3390/ijms25021067

Gomes, J. M., Esper, E. A., & Ribeiro, A. A. (2023). Avaliação da relação entre linfócitos infiltrantes e resposta inflamatória no câncer de mama: Uma revisão sistemática. *Research, Society and Development*, *12*(14), e64121444503. https://doi.org/10.33448/rsd-v12i14.44503

Gonzalez, N., Perez Küper, M., Garcia Fallit, M., Nicola Candia, A. J., Peña Agudelo, J. A., Suarez Velandia, M., Romero, A. C., Videla-Richardson, G. A., & Candolfi, M. (2025). Predicting Treatment Outcomes in Glioblastoma: A Risk Score Model for TMZ Resistance and Immune Checkpoint Inhibition. *Biology*, *14*(5), 572. https://doi.org/10.3390/biology14050572

Guha, S., Ferrie, R. P., Ghimire, J., Ventura, C. R., Wu, E., Sun, L., Kim, S. Y., Wiedman, G. R., Hristova, K., & Wimley, W. C. (2021). Applications and evolution of melittin, the quintessential membrane active peptide. *Biochemical Pharmacology*, *193*, 114769. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114769

Hanahan, D., & Coussens, L. M. (2012). Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell*, *21*(3), 309–322. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.02.022

Hansen, R. J., Nagasubramanian, R., Delaney, S. M., Samson, L. D., & Dolan, M. E. (2007). Role of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in protecting from alkylating agent-induced toxicity and mutations in mice. *Carcinogenesis*, *28*(5), 1111–1116. https://doi.org/10.1093/carcin/bgl218

Hegi, M. E., Diserens, A.-C., Gorlia, T., Hamou, M.-F., de Tribolet, N., Weller, M., Kros, J. M., Hainfellner, J. A., Mason, W., Mariani, L., Bromberg, J. E. C., Hau, P., Mirimanoff, R. O., Cairncross, J. G., Janzer, R. C., & Stupp, R. (2005). MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *The New England Journal of Medicine*, *352*(10), 997–1003. https://doi.org/10.1056/NEJMoa043331

Hirose, Y., Kreklau, E. L., Erickson, L. C., Berger, M. S., & Pieper, R. O. (2003). Delayed repletion of O6-methylguanine—DNA methyltransferase resulting in failure to protect the human glioblastoma cell line SF767 from

temozolomide-induced cytotoxicity. *Journal of Neurosurgery*, *98*(3), 591–598. https://doi.org/10.3171/jns.2003.98.3.0591

Jamasbi, E., Mularski, A., & Separovic, F. (2016). Model Membrane and Cell Studies of Antimicrobial Activity of Melittin Analogues. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, *16*(1), 40–45. https://doi.org/10.2174/1568026615666150703115919

Jeong, Y.-J., Choi, Y., Shin, J.-M., Cho, H.-J., Kang, J.-H., Park, K.-K., Choe, J.-Y., Bae, Y.-S., Han, S.-M., Kim, C.-H., Chang, H.-W., & Chang, Y.-C. (2014). Melittin suppresses EGF-induced cell motility and invasion by inhibiting PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in breast cancer cells. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, *68*, 218–225. https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.03.022

Kaina, B., Christmann, M., Naumann, S., & Roos, W. P. (2007). MGMT: Key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA Repair*, *6*(8), 1079–1099. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2007.03.008

Knutson, K. L., & Disis, M. L. (2005). Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, *54*(8), 721–728. https://doi.org/10.1007/s00262-004-0653-2

Lacroix, M., Abi-Said, D., Fourney, D. R., Gokaslan, Z. L., Shi, W., DeMonte, F., Lang, F. F., McCutcheon, I. E., Hassenbusch, S. J., Holland, E., Hess, K., Michael, C., Miller, D., & Sawaya, R. (2001). A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: Prognosis, extent of resection, and survival. *Journal of Neurosurgery*, *95*(2), 190–198. https://doi.org/10.3171/jns.2001.95.2.0190

Lee, S. Y. (2016). Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Genes & Diseases*, *3*(3), 198–210. https://doi.org/10.1016/j.gendis.2016.04.007

Leece, R., Xu, J., Ostrom, Q. T., Chen, Y., Kruchko, C., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2017). Global incidence of malignant brain and other central nervous system tumors by histology, 2003-2007. *Neuro-Oncology*, *19*(11), 1553–1564. https://doi.org/10.1093/neuonc/nox091

Li, R., Tao, T., Ren, Q., Xie, S., Gao, X., Wu, J., Chen, D., & Xu, C. (2022). Key Genes Are Associated with the Prognosis of Glioma, and Melittin Can Regulate the Expression of These Genes in Glioma U87 Cells. *BioMed Research International*, *2022*(1), 7033478. https://doi.org/10.1155/2022/7033478

Lim, H. N., Baek, S. B., & Jung, H. J. (2019). Bee Venom and Its Peptide Component Melittin Suppress Growth and Migration of Melanoma Cells via

Inhibition of PI3K/AKT/mTOR and MAPK Pathways. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *24*(5), 929. https://doi.org/10.3390/molecules24050929

Liu, G., Yuan, X., Zeng, Z., Tunici, P., Ng, H., Abdulkadir, I. R., Lu, L., Irvin, D., Black, K. L., & Yu, J. S. (2006). Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Molecular Cancer*, *5*, 67. https://doi.org/10.1186/1476-4598-5-67

Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Kleihues, P., & Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: A summary. *Acta Neuropathologica*, *131*(6), 803–820. https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1

Louis, D. N., Perry, A., Wesseling, P., Brat, D. J., Cree, I. A., Figarella-Branger, D., Hawkins, C., Ng, H. K., Pfister, S. M., Reifenberger, G., Soffietti, R., von Deimling, A., & Ellison, D. W. (2021). The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: A summary. *Neuro-Oncology*, *23*(8), 1231–1251. https://doi.org/10.1093/neuonc/noab106

Małek, A., Kocot, J., Mitrowska, K., Posyniak, A., & Kurzepa, J. (2022). Bee Venom Effect on Glioblastoma Cells Viability and Gelatinase Secretion. *Frontiers in Neuroscience*, *16*, 792970. https://doi.org/10.3389/fnins.2022.792970

McDonald, F. E., Ironside, J. W., Gregor, A., Wyatt, B., Stewart, M., Rye, R., Adams, J., & Potts, H. W. W. (2002). The prognostic influence of bcl-2 in malignant glioma. *British Journal of Cancer*, *86*(12), 1899–1904. https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600217

Najafi, M., Hashemi Goradel, N., Farhood, B., Salehi, E., Nashtaei, M. S., Khanlarkhani, N., Khezri, Z., Majidpoor, J., Abouzaripour, M., Habibi, M., Kashani, I. R., & Mortezaee, K. (2019). Macrophage polarity in cancer: A review. *Journal of Cellular Biochemistry*, *120*(3), 2756–2765. https://doi.org/10.1002/jcb.27646

Ohka, F., Natsume, A., Motomura, K., Kishida, Y., Kondo, Y., Abe, T., Nakasu, Y., Namba, H., Wakai, K., Fukui, T., Momota, H., Iwami, K., Kinjo, S., Ito, M., Fujii, M., & Wakabayashi, T. (2011). The global DNA methylation surrogate LINE-1 methylation is correlated with MGMT promoter methylation and is a better prognostic factor for glioma. *PloS One*, *6*(8), e23332. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023332

Olar, A., & Aldape, K. D. (2014). Using the molecular classification of glioblastoma to inform personalized treatment. *The Journal of Pathology*, *232*(2), 165–177. https://doi.org/10.1002/path.4282

Olson, R. A., Brastianos, P. K., & Palma, D. A. (2011). Prognostic and predictive value of epigenetic silencing of MGMT in patients with high grade

gliomas: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Neuro-Oncology*, *105*(2), 325–335. https://doi.org/10.1007/s11060-011-0594-5

Ostrom, Q. T., Cioffi, G., Gittleman, H., Patil, N., Waite, K., Kruchko, C., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2019). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2012-2016. *Neuro-Oncology*, *21*(Suppl 5), v1–v100. https://doi.org/10.1093/neuonc/noz150

Pardoll, D. M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews. Cancer*, *12*(4), 252–264. https://doi.org/10.1038/nrc3239

Pianko, M. J., Liu, Y., Bagchi, S., & Lesokhin, A. M. (2017). Immune checkpoint blockade for hematologic malignancies: A review. *Stem Cell Investigation*, *4*, 32. https://doi.org/10.21037/sci.2017.03.04

Preusser, M., Charles Janzer, R., Felsberg, J., Reifenberger, G., Hamou, M.-F., Diserens, A.-C., Stupp, R., Gorlia, T., Marosi, C., Heinzl, H., Hainfellner, J. A., & Hegi, M. (2008). Anti-O6-methylguanine-methyltransferase (MGMT) immunohistochemistry in glioblastoma multiforme: Observer variability and lack of association with patient survival impede its use as clinical biomarker. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, *18*(4), 520–532. https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2008.00153.x

Quail, D. F., & Joyce, J. A. (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature Medicine*, *19*(11), 1423–1437. https://doi.org/10.1038/nm.3394

Rady, I., Siddiqui, I. A., Rady, M., & Mukhtar, H. (2017). Melittin, a major peptide component of bee venom, and its conjugates in cancer therapy. *Cancer Letters*, *402*, 16–31. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.05.010

Ralhan, R., & Kaur, J. (2007). Alkylating agents and cancer therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, *17*(9), 1061–1075. https://doi.org/10.1517/13543776.17.9.1061

Rieger, L., Weller, M., Bornemann, A., Schabet, M., Dichgans, J., & Meyermann, R. (1998). BCL-2 family protein expression in human malignant glioma: A clinical-pathological correlative study. *Journal of the Neurological Sciences*, *155*(1), 68–75. https://doi.org/10.1016/s0022-510x(97)00277-3

Rizkallah, J., Charbel, N., Yassine, A., El Masri, A., Raffoul, C., El Sardouk, O., Ghezzawi, M., Abou Nasr, T., & Kreidieh, F. (2025). Melittin-Based Nanoparticles for Cancer Therapy: Mechanisms, Applications, and Future Perspectives. *Pharmaceutics*, *17*(8), 1019. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics17081019

Sakuishi, K., Apetoh, L., Sullivan, J. M., Blazar, B. R., Kuchroo, V. K., & Anderson, A. C. (2010). Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell

exhaustion and restore anti-tumor immunity. *Journal of Experimental Medicine*, *207*(10), 2187–2194. https://doi.org/10.1084/jem.20100643

Seidel, J. A., Otsuka, A., & Kabashima, K. (2018). Anti-PD-1 and Anti-CTLA-4 Therapies in Cancer: Mechanisms of Action, Efficacy, and Limitations. *Frontiers in Oncology*, *8*, 86. https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00086

Shen, J., Liao, B., Gong, L., Li, S., Zhao, J., Yang, H., Gong, Y., & Li, Y. (2025). CD39 and CD73: Biological functions, diseases and therapy. *Molecular Biomedicine*, *6*(1), 97. https://doi.org/10.1186/s43556-025-00345-9

Stupp, R., Taillibert, S., Kanner, A., Read, W., Steinberg, D., Lhermitte, B., Toms, S., Idbaih, A., Ahluwalia, M. S., Fink, K., Di Meco, F., Lieberman, F., Zhu, J.-J., Stragliotto, G., Tran, D., Brem, S., Hottinger, A., Kirson, E. D., Lavy-Shahaf, G., … Ram, Z. (2017). Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*, *318*(23), 2306–2316. https://doi.org/10.1001/jama.2017.18718

Tang, J., Karbhari, N., & Campian, J. L. (2025). Therapeutic Targets in Glioblastoma: Molecular Pathways, Emerging Strategies, and Future Directions. *Cells*, *14*(7), 494. https://doi.org/10.3390/cells14070494

Tentori, L., & Graziani, G. (2009). Recent Approaches to Improve the Antitumor Efficacy of Temozolomide. *Current Medicinal Chemistry*, *16*(2), 245–257. https://doi.org/10.2174/092986709787002718

Tomar, V. S., Patil, V., & Somasundaram, K. (2020). Temozolomide induces activation of Wnt/β-catenin signaling in glioma cells via PI3K/Akt pathway: Implications in glioma therapy. *Cell Biology and Toxicology*, *36*(3), 273–278. https://doi.org/10.1007/s10565-019-09502-7

Wang, A., Zheng, Y., Zhu, W., Yang, L., Yang, Y., & Peng, J. (2022). Melittin-Based Nano-Delivery Systems for Cancer Therapy. *Biomolecules*, *12*(1), 118. https://doi.org/10.3390/biom12010118

Wang, L., Zhang, J., Zhang, W., Zheng, M., Guo, H., Pan, X., Li, W., Yang, B., & Ding, L. (2024). The inhibitory effect of adenosine on tumor adaptive immunity and intervention strategies. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, *14*(5), 1951–1964. https://doi.org/10.1016/j.apsb.2023.12.004

Wang, X.-F., Shi, Z.-M., Wang, X.-R., Cao, L., Wang, Y.-Y., Zhang, J.-X., Yin, Y., Luo, H., Kang, C.-S., Liu, N., Jiang, T., & You, Y.-P. (2012). MiR-181d acts as a tumor suppressor in glioma by targeting K-ras and Bcl-2. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, *138*(4), 573–584. https://doi.org/10.1007/s00432-011-1114-x

Watanabe, T., Nobusawa, S., Kleihues, P., & Ohgaki, H. (2009). IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas. *The American Journal of Pathology*, *174*(4), 1149–1153. https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080958

Weller, M., Wen, P. Y., Chang, S. M., Dirven, L., Lim, M., Monje, M., & Reifenberger, G. (2024). Glioma. *Nature Reviews Disease Primers*, *10*(1), 33. https://doi.org/10.1038/s41572-024-00516-y

Wen, P. Y., & Kesari, S. (2008). Malignant Gliomas in Adults. *New England Journal of Medicine*, *359*(5), 492–507. https://doi.org/10.1056/NEJMra0708126

Yang, C., Li, Z., Shi, Z., He, K., Tian, A., Wu, J., Zhang, Y., & Li, Z. (2014). Regulation of cell survival by the HIP-55 signaling network. *Molecular bioSystems*, *10*(6), 1393–1399. https://doi.org/10.1039/c3mb70552h

Zhang, J., Stevens, M. F. G., & Bradshaw, T. D. (2012). Temozolomide: Mechanisms of action, repair and resistance. *Current Molecular Pharmacology*, *5*(1), 102–114. https://doi.org/10.2174/1874467211205010102

Zhang, L.-H., Yin, A.-A., Cheng, J.-X., Huang, H.-Y., Li, X.-M., Zhang, Y.-Q., Han, N., & Zhang, X. (2015). TRIM24 promotes glioma progression and enhances chemoresistance through activation of the PI3K/Akt signaling pathway. *Oncogene*, *34*(5), 600–610. https://doi.org/10.1038/onc.2013.593

Zhou, B. B., & Elledge, S. J. (2000). The DNA damage response: Putting checkpoints in perspective. *Nature*, *408*(6811), 433–439. https://doi.org/10.1038/35044005